



14 JUL 2004

Ministero delle Attività Produttive

Direzione Generale per lo Sviluppo Produttivo e la Competitività

Ufficio Italiano Brevetti e Marchi

Ufficio G2

Autenticazione di copia di documenti relativi alla domanda di brevetto per: Invenzione Industriale

N. RM2002 A 000014



Si dichiara che l'unita copia è conforme ai documenti originali.

depositati con la domanda di brevetto sopraspecificata, i cui dati

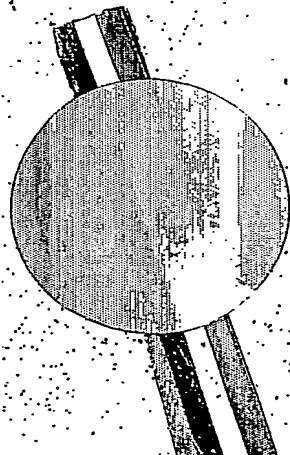
risultano dall'accluso processo verbale di deposito.

DOCUMENT DE PRIORITÉ

PRÉSENTÉ OU TRANSMIS
CONFORMÉMENT À LA
RÈGLE 17.1.a) OU b)

25 FEB. 2003

Roma, il



IL DIRIGENTE

Elena Marinelli

Sig.ra E. MARINELLI

AL MINISTERO DELL'INDUSTRIA DEL COMMERCIO E DELL'ARTIGIANATO

UFFICIO CENTRALE BREVETTI - ROMA

DOMANDA DI BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE, DEPOSITO RISERVE, ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO

MODULO A

marca
da
bollo

A. RICHIEDENTE (1)

SIGMA-TAU INDUSTRIE FARMACEUTICHE RIUNITE S.p.A.

N.G.

S.P.

1) Denominazione

ROMA

codice

00885531004

Residenza

2) Denominazione

Residenza

B. RAPPRESENTANTE DEL RICHIEDENTE PRESSO L'U.C.B.

cognome nome

cod. fiscale

denominazione studio di appartenenza

via n. città can. (prov)

C. DOMICILIO ELETTIVO-DESTINATARIO

SIGMA-TAU INDUSTRIE FARMACEUTICHE RIUNITE S.p.A.

via le Shakespeare

n.

0047

città

ROMA

cap.

00144

(prov)

RM

D. TITOLO

classe proposta (sez/cl/sci)

gruppo/sottogruppo

Derivati di acidi α -feniltiocarbossilici e α -fenilossicarbossilici
utili per il trattamento di patologie che rispondono all'attivazione
del recettore PPAR α ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO: SI ☐ NO ☒

SE ISTANZA DATA

N° PROTOCOLLO

E. INVENTORI/DESIGNATI

cognome nome

cognome nome

1) GIANNESSI Fabio

(3)

TASSONI Emanuela

2) DELL'UOMO Natalina

(4)

TINTI Maria Ornella

F. PRIORITÀ

denominazione o organizzazione

tipo di priorità

numero di domanda

data di deposito

allegato
S/R

SCIoglimento RISERVE

Data

N° Protocollo

1) NESSUNA

2)

G. CENTRO ABILITATO DI RACCOLTA CULTURE DI MICRORGANISMI, denominazione

H. ANNOTAZIONI SPECIALI

NESSUNA

DOCUMENTAZIONE ALLEGATA

N. es.

Doc. 1)

PROV

q. pag. 38

Doc. 2)

PROV

n. tav. 1

Doc. 3)

RIS

Doc. 4)

RIS

Doc. 5)

RIS

Doc. 6)

RIS

Doc. 7)

RIS

riassunto con disegno principale, descrizione e rivendicazioni (obbligatorio 1-esemplare)

disegno (obbligatorio se citato in descrizione, 1 esemplare)

lettera d'incarico, procura o riferimento procura generale

designazione inventore

documenti di priorità con traduzione in italiano

autorizzazione o atto di cessione

nominativo completo del richiedente

8) attestati di versamento, totale lire 565.000. = (cinquecentosessantacinquemila ==)

obbligatorio

9) marche da bollo per attestato di brevetto di lire

obbligatorio

COMPILATO IL 15/01/2002

FIRMA DEL(1) RICHIEDENTE (1)

Marco Spadaro

SIGMA-TAU INDUSTRIE FARMACEUTICHE RIUNITE S.p.A.

CONTINUA SI/NO SI

DEL PRESENTE ATTO SI RICHIEDE COPIA AUTENTICA SI/NO SI

Camera di Commercio Industria Artigianato e Agricoltura di

ROMA

codice 58

VERBALE DI DEPOSITO

NUMERO DI DOMANDA

RM 2002 A 00004

L'anno

duemiladue

il giorno

quindici

del mese di

gennaio

Il(1) richiedente(i) sopraindicato(i) ha(hanno) presentato a me sottoscritto la presente domanda, corredata di n. fogli aggiuntivi per la concessione del brevetto soprariportato.

I. ANNOTAZIONI VARIE DELL'UFFICIALE ROGANTE

IL DEPOSITANTE

L'UFFICIALE ROGANTE
Silvia Altieri

FOGLIO AGGIUNTIVO n.

di totali

AN.

REG. 1
RM 2002 A 000014

A. RICHIEDENTE (I)

Denominazione		codice	
Residenza			
Denominazione		codice	
Residenza			
Denominazione		codice	
Residenza			
Denominazione		codice	
Residenza			
Denominazione		codice	
Residenza			
Denominazione		codice	
Residenza			

E. INVENTORI DESIGNATI

cognome nome	cognome nome
05 SCIARRONI Anna Floriana	
06 BANDERA Monica	
07 PESSOTTO Pompeo	
08 ARDUINI Arduino	

F. PRIORITÀ

nazione o organizzazione	tipo di priorità	numero di domanda	data di deposito	allegato S/R

SCIOGLIMENTO RISERVE	
Data	N° Protocollo

FIRMA DEL (I) RICHIEDENTE (I)

Marco Madaro

SIGMA-TAU INDUSTRIE FARMACEUTICHE RIUNITE S.p.A.

SPAZIO RISERVATO ALL'UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI



RIASSUNTO INVENZIONE CON DISEGNO PRINCIPALE

PROSPETTO A

NUMERO DOMANDA

RM 2002 A 000014

DATA DI DEPOSITO

15/01/2002

NUMERO BREVETTO

DATA DI RILASCIO

/ /

A. RICHIEDENTE (I)

Denominazione

SIGMA-TAU INDUSTRIE FARMACEUTICHE RIUNITE S.p.A.

Residenza

Viale Shakespeare, 47 - 00144 ROMA

D. TITOLO

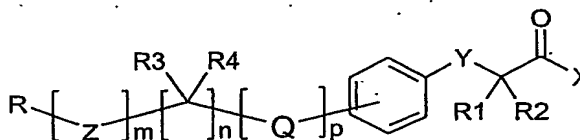
Derivati di α -feniltiocarbossilici e α -fenilossicarbossilici utili per il trattamento di patologie che rispondono all'attivazione del recettore PPAR α

Classe proposta (sez./cl./sc/l)

(gruppo/sottogruppo)

L. RIASSUNTO

Vengono descritti composti di formula (I)



(I)

in cui i sostituenti hanno i significati descritti nel testo, utili per il trattamento di patologie che rispondono all'attivazione del recettore PPAR α , quali l'insufficienza cardiaca, le iperlipemie e l'aterosclerosi.



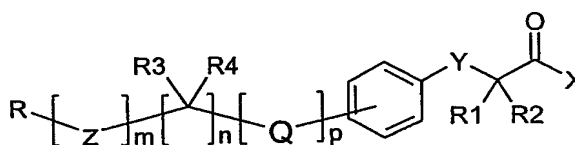
M. DISEGNO

RM 2002 A 000017

SIGMA-TAU INDUSTRIE FARMACEUTICHE
RIUNITE S.p.A

2

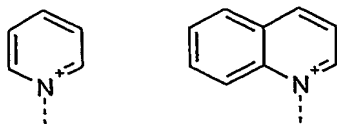
La presente invenzione riguarda derivati di acidi α -feniltiocarbossilici e α -fenilossicarbossilici, utili per il trattamento di patologie che rispondono all'attivazione del recettore PPAR α (Peroxisome Proliferator Activated Receptors), di formula generale (I):



(I)

in cui:

R rappresenta -H; -YCR5R6COX; arile o eteroarile mono o
biciclici eventualmente sostituiti con uno o più gruppi -
10 YCR5R6COX, alogeno, nitro, idrossi, alchile e alcossi eventualmente
sostituiti con uno o più gruppi alogeno; arilalchile o eteroarilalchile
mono o biciclici in cui l'arile o l'eteroarile sono eventualmente
sostituiti con uno o più gruppi gruppi -YCR5R6COX, alogeno, nitro,
idrossi, alchile e alcossi eventualmente sostituiti con uno o più
15 gruppi alogeno; in cui l'eteroarile può essere eventualmente carico,
del tipo:



in cui la carica positiva è bilanciata da un opportuno controione negativo;

m rappresenta 0-1;

n rappresenta 0-3; quando n rappresenta 1, R3 e R4 uguali o diversi sono scelti fra H o alchile C₁-C₅; quando n rappresenta 2 o 3, R3 è uguale a R4 e rappresenta H;

5 p rappresenta 0-1;

X rappresenta -OH, -O-alchile C₁-C₃;

R1 ed R2 uguali o diversi sono scelti tra: -H; alchile C₁-C₅, -alcossi eventualmente sostituito con uno o più gruppi alogeno;

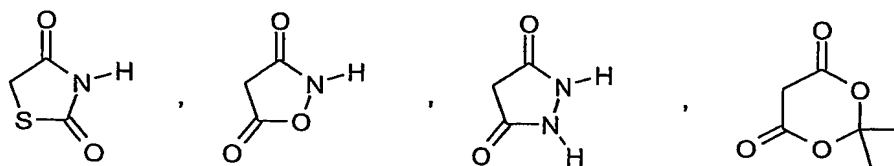
-fenossi eventualmente sostituito con uno o più gruppi alogeno, nitro, idrossi, alchile;

-benzilossi eventualmente sostituito con uno o più gruppi alogeno, nitro, idrossi, alchile;

-COX;

oppure R1 o R2 insieme al COX della formula generale (I)

15 formano un ciclo del tipo:



R5 e R6 uguali o diversi sono scelti fra i gruppi elencati per R1 ed R2;

Q e Z uguali o diversi sono scelti fra: NH, O, S, -NHC(O)O-,
20 NHC(O)NH-, -NHC(O)S-, -OC(O)NH-, -NHC(S)O-, -NHC(S)NH-,
C(O)NH-;

e Y rappresenta O, S.

Le patologie che rispondono all'attivazione del recettore PPAR α in accordo con la presente invenzione sono l'insufficienza cardiaca, le iperlipemie e l'aterosclerosi.

5 I PPAR, membri della superfamiglia dei recettori nucleari, sono dei fattori di trascrizione attivati da ligandi che regolano l'espressione genica.

Sono state individuate diverse isoforme di PPAR: PPAR α , PPAR δ (talvolta indicati come β) e PPAR γ (J. Med. Chem. 2000, 43, 527-550;
10 Nature 2000, 405, 421-424).

Il PPAR α appartiene alla grande famiglia dei recettori degli ormoni steroidei (Kersten et al., Nature 405: 421 - 424, 2000).

Questo recettore è stato per la prima volta identificato sulla base del suo controllo dei geni che codificano per gli enzimi
15 dell'ossidazione degli acidi grassi in risposta a proliferatori perossisomali come i derivati dell'acido fibrico (Issemann and Green, Nature 347: 645 - 650, 1990).

Leone et al., in Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 7473-7478, 1999 hanno confermato il ruolo critico nell'ossidazione degli acidi grassi
20 nei tessuti svolto dal PPAR α .

L'insufficienza cardiaca è un'importante causa d'invalidità e di morte improvvisa. Essa è dovuta all'incapacità del cuore di pompare sangue in quantità sufficiente al fabbisogno metabolico dei vari tessuti.



Questa condizione si accompagna a profondi cambiamenti nel sistema di controllo delle funzioni elettriche e meccaniche del cuore.

Le alterazioni biochimiche e neuroormonali che si osservano rappresentano un meccanismo di adattamento alla mutata condizione emodinamica del cuore scompensato, caratterizzata principalmente da una riduzione della gettata cardiaca, un aumento delle resistenze periferiche e una ritenzione ematica a monte del cuore insufficiente, con conseguente dilatazione atriale e scompenso retrogrado.

10 I meccanismi fisiopatologici implicati nell'insorgenza, sviluppo e progressione della insufficienza cardiaca devono ancora essere in parte chiariti.

Composti utili per il trattamento di patologie che rispondono all'attivazione del recettore PPAR α sono già noti.

15 In Gen. Pharmacol. 1995 Sep;26(5):897-904 viene riportato che l'etomoxir ha un effetto benefico sul rendimento cardiaco ed i recettori PPAR sono coinvolti.

In Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids; 1999 May-Jun; 60(5-6): 339-43 viene riportato che l'etomoxir ed il recettore PPAR α sono coinvolti nel controllo del metabolismo lipidico.

20 In Am. J. Physiol. Renal. Physiol. 2000 Apr; 278(4):F667-75 viene riportato che l'etomoxir è un attivatore del recettore PPAR α e che questa attivazione induce una regolazione della ossidazione degli acidi grassi.

In Circulation 1997, 96:3681-3686, ed in Br. J. Pharmacol. 1999, 126:501-507 viene riportato che l'etomoxir è efficace nel migliorare la funzionalità del miocardio in modelli animali di ipertrofia ed insufficienza cardiaca.

5 In Clin. Sci. (Colch) 2000; Jul.; 99(1):27-35 viene riportato che pazienti affetti da insufficienza cardiaca hanno migliorato le funzioni cardiache dopo trattamento con etomoxir.

In Curr. Opin. Lipidol. 10: 245 - 247, 1999, viene riportato che i fibrati attivando il recettore PPAR α stimolano l'ossidazione degli
10 acidi grassi, inibiscono l'infiammazione delle pareti vascolari, e proteggono dall'aterosclerosi.

WO 98/05331 viene riportato che i fibrati attivando il recettore PPAR α hanno un effetto protettivo verso l'ipertensione, disturbi a carico delle coronarie e da fenomeni ateromatosi, causati dal
15 diabete.

Ad oggi composti capaci di attivare il recettore PPAR α , utili per il trattamento dello scompenso cardiaco, sono ancora pochi.

In questo settore della medicina è quindi molto sentita la necessità di avere a disposizione nuovi farmaci sempre più specifici
20 per il trattamento di detta patologia.

I composti noti precedentemente citati non sono esenti da inconvenienti.

Infatti, in Therapie 1991 Sep-Oct; 46(5):351-4 viene riportato che i fibrati causano numerosi effetti collaterali quali reazioni
25 cutanee, emorragie, pancreatiti e disturbi del sistema nervoso.

In Current Pharmaceutical Design, 1998; 4; 1-15 viene riportato che l'etomoxir induce ipertrofia miocardica ed aumenta il rischio di infarto del miocardio.

È pertanto molto sentita la necessità di avere a disposizione
5 nuovi attivatori del recettore PPAR α dotati di attività curativa per le patologie precedentemente citate, che non presentino gli inconvenienti dei composti noti sopra citati.

È stato ora sorprendentemente trovato che i composti di formula (I) sono degli attivatori del recettore PPAR α , e si prestano ad
10 essere utilizzati per la cura di patologie che rispondono alla attivazione di detto recettore PPAR α .

Nell'ambito delle patologie che rispondono all'attivazione del recettore PPAR α , come sopra riportato troviamo l'insufficienza cardiaca, le iperlipemie e l'aterosclerosi.

15 Sono pertanto oggetto della presente invenzione composti di formula (I) ed il loro uso in campo medico.

Ulteriore oggetto della presente invenzione sono le composizioni farmaceutiche che comprendono come principio attivo un composto di formula (I) ed almeno un eccipiente e/o diluente
20 farmaceuticamente accettabile.

Ulteriore oggetto della presente invenzione è l'uso dei composti di formula (I) per la preparazione di un medicamento per il trattamento di patologie che rispondono alla attivazione del recettore PPAR α , esempi non limitativi di dette patologie sono l'insufficienza
25 cardiaca, le iperlipemie e l'aterosclerosi.

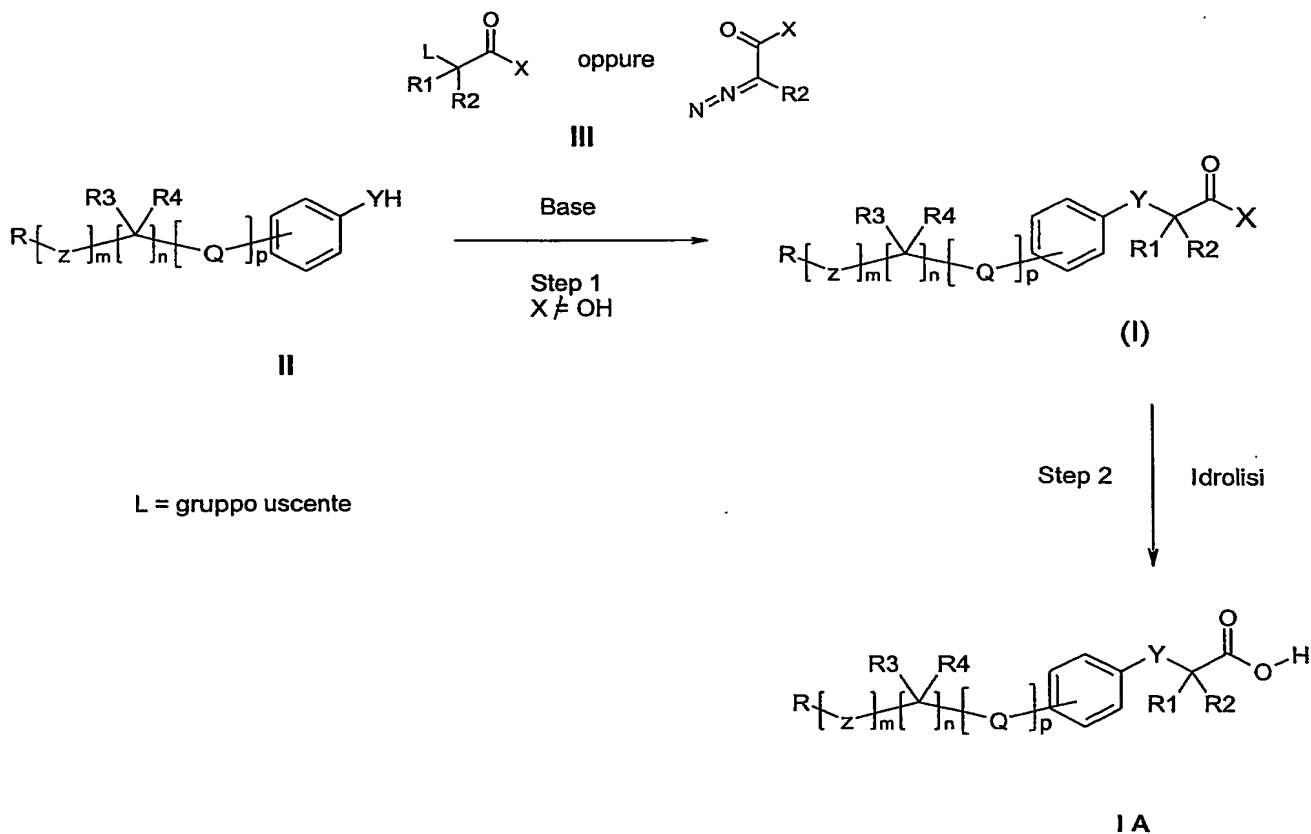
Il seguenti esempi illustrano ulteriormente l'invenzione.

Metodi generali di sintesi

I seguenti schemi illustrano i metodi utilizzati per la sintesi dei composti di formula (I).

5 Dove non altrimenti specificato, il significato dei vari simboli è coincidente con quello riportato nella formula generale (I). Il procedimento di idrolisi descritto nel metodo A può essere applicato anche agli altri metodi.

METODO A

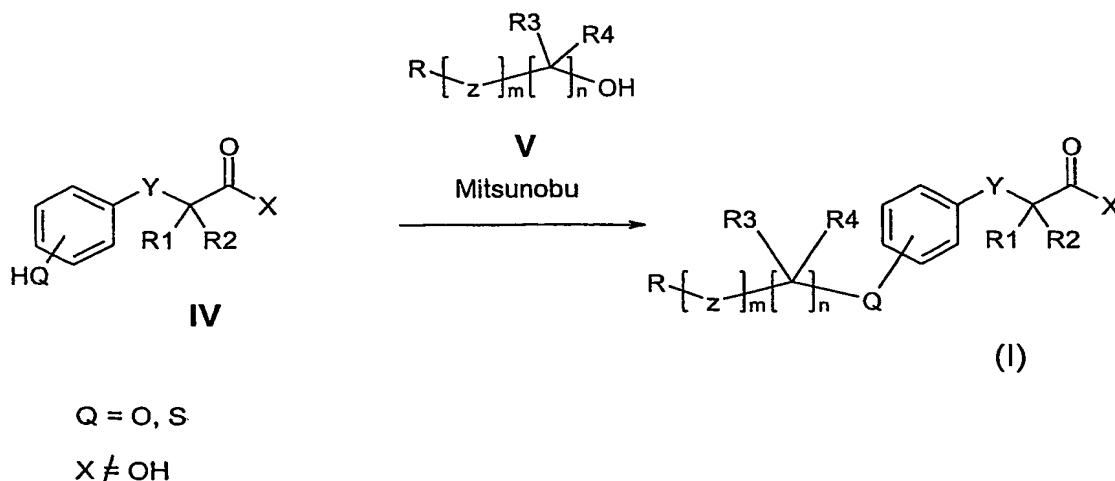


La preparazione dei composti di formula generale (I) venne effettuata facendo reagire con una base, preferibilmente inorganica,



preferibilmente sodio idruro, il composto di formula generale **II** per formare l'anione corrispondente il quale venne poi fatto reagire con un composto di formula generale **III** contenente un gruppo uscente, come cloro, bromo, iodio, mesile, tostile e diazo (nel caso del gruppo diazo, invece di una base inorganica si usa rodio bivalente acetato dimero come catalizzatore), ad esempio 2-metil-alfa-bromoisobutirrato, in un solvente polare come acetonitrile, toluene o preferibilmente dimetilformammide, per un tempo compreso fra 18 e 48 ore a temperatura compresa fra 10 e 50°C, preferibilmente a 25°C. Il prodotto così ottenuto venne sottoposto ad idrolisi basica o acida, utilizzando ad esempio NaOH, oppure ad esempio una miscela di HCl/acido acetico, ad una temperatura compresa fra 10 e 100°C, preferibilmente 25°C, per un tempo compreso fra 1 ora e 72 ore, preferibilmente 3 ore, per fornire l'acido corrispondente **I A**.

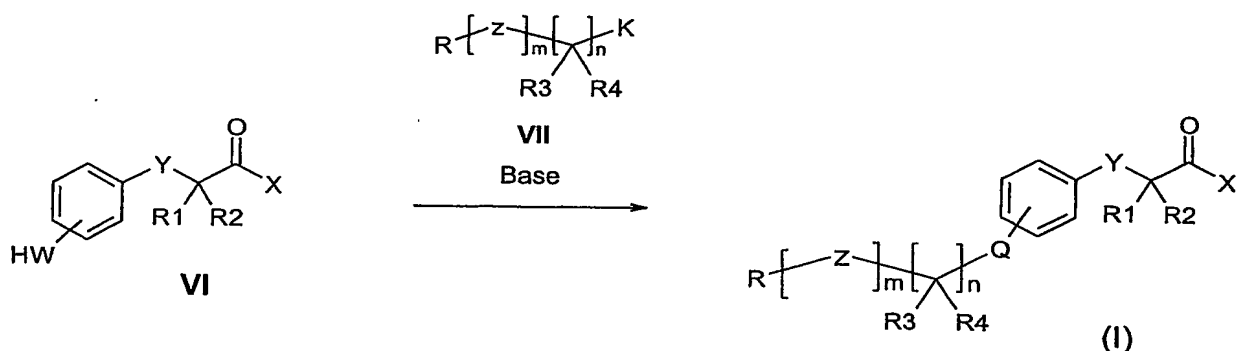
METODO B



La preparazione dei composti aventi formula generale (I) venne effettuata a partire da composti di struttura generale **IV**, che

vennero fatti reagire con un alcol di struttura generale **V** nelle condizioni classiche delle reazioni di Mitsunobu, come descritto in Synthesis 1981, 1-28, utilizzando solventi anidri e aprotici come benzene, toluene, etere o preferibilmente tetraidrofurano, per un tempo compreso fra 30 minuti e 72 ore, preferibilmente 48 ore, a temperatura compresa fra 10 e 40 °C, preferibilmente a 25°C.

METODO C



W = O, NH, S

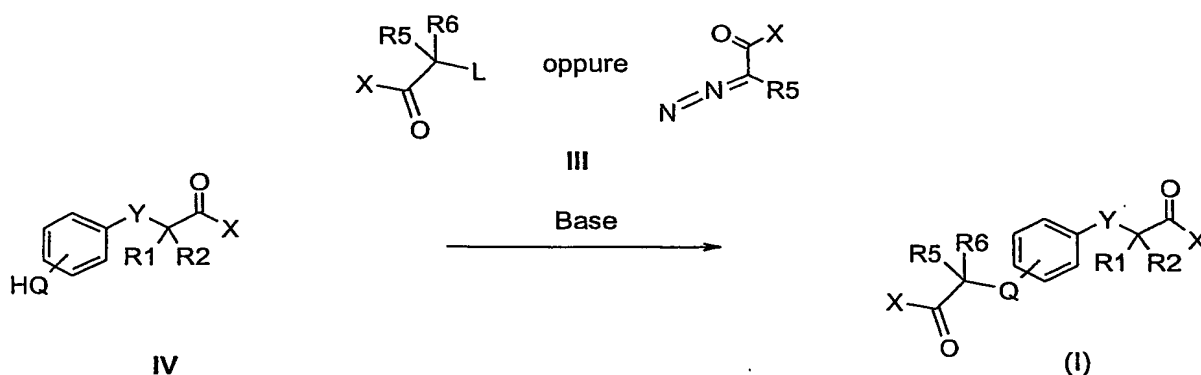
K = -NCS, -NCO, -OC(O)Cl, -COOH

Q ≠ N, O, S

10 I composti preparati con questo metodo vennero ottenuti a partire da **VI** sciolto in solventi aprotici, ad esempio toluene, etere, benzene, preferibilmente tetraidrofurano, poi addizionato del relativo isocianato, tioisocianato o cloroformiato **VII**, eventualmente in presenza di una base inorganica o organica, preferibilmente trietilammina in quantità catalitica o stechiometrica e lasciando
15 reagire per un tempo compreso fra 6 e 72 ore, preferibilmente 48 ore

a temperatura compresa fra 10 e 40°C, preferibilmente 25°C. Nel caso in cui K è uguale a COOH si utilizzarono degli agenti condensanti come dietilfosforocianidato, EEDQ, DCC o CDI e simili in rapporto di 1-3 equivalenti rispetto ai substrati, preferibilmente 1-1,5 equivalenti, oppure si passò attraverso la formazione di cloruro dell'acido, effettuando la reazione di condensazione in solventi organici come DMF, CH₃CN, CHCl₃, THF e simili, ad una temperatura compresa tra 20 e 80°C, preferibilmente 25°C, in un tempo di reazione compreso tra 18 ore e 3 giorni, preferibilmente 24 ore.

METODO D



Q = O, S

X diverso da OH

L = gruppo uscente

La preparazione dei composti di formula generale (I) (m ed n sono uguali a zero e Y e Q sono uguali a O e/o S) venne effettuata ad

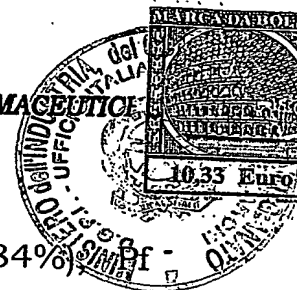
esempio secondo quanto descritto in Tetrahedron, 1990, 46 (3), 967-978 a partire dal prodotto **IV** che venne fatto reagire con un composto di formula generale **III** contenente un gruppo uscente, come cloro, bromo, iodio, mesile, tostile e diazo (nel caso del gruppo diazo, invece di una base inorganica si usa rodio bivalente acetato dimero come catalizzatore), ad esempio 2-metil-alfa-bromoisobutirrato, in presenza di una base, come carbonato di potassio, e di un catalizzatore per trasferimento di fase, come ad esempio tetrabutylammonio bromuro (TBAB) in solventi aprotici come toluene, a temperature comprese fra 25°C e la temperatura di riflusso del solvente scelto, per un tempo compreso tra 1 e 5 giorni, preferibilmente 2 giorni.

ESEMPIO 1

Preparazione di metil 2-(4-idrossifeniltio)isobutirrato (ST 1923)

Metodo A Step 1

A 4-mercaptofenolo (0,500 g, 4,0 mmoli) in 10 mL di CH₃CN anidro, venne aggiunto NaH 80% (0,144 g, 4,8 mmoli). La miscela venne raffreddata a 0°C e dopo 5 minuti venne aggiunto metil- α -bromoisobutirrato (0,724 g, 4,0 mmoli). La reazione venne lasciata a temperatura ambiente per due giorni sotto agitazione magnetica. Dopo questo tempo la miscela venne versata in H₂O ed estratta con etile acetato, la fase acquosa venne quindi acidificata ed estratta nuovamente con etile acetato. Le fasi organiche riunite vennero essiccate su Na₂SO₄, filtrate ed evaporate. Il residuo ottenuto venne purificato mediante cromatografia su gel di silice usando come



eluente CHCl_3 . Si ottennero 0,760 g di prodotto (resa: 84%)
(punto di fusione): 110-112°C; TLC: gel di silice, eluente CHCl_3 , Rf
(rapporto frontale): 0,11; ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) δ 7.30 (d, 2H),
6.73 (d, 2H), 5.57 (brm, 1H), 3.70 (s, 3H), 1.45 (s, 6H); HPLC:
5 Colonna: Symmetry - C_{18} , (5 μm) 4,6 x 250 mm, T: 30°C, fase mobile
 $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ 50/50 (v/v), pH: tal quale, flusso: 0,75 mL/min,
rivelatore UV 205 nm, tempo di ritenzione 10,14 min; A.E. (analisi
elementare) conforme per $\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{O}_3\text{S}$.

ESEMPIO 2

10 Preparazione dell'acido 2-(4-idrossifeniltio)isobutirrico (ST 1981)

Metodo A Step 2

A metil 2-(4-idrossifeniltio)isobutirrato (ST 1923) (0,200 g, 0,88
mmoli) si aggiunsero 2,7 mL di acido acetico e 2,7 mL di acido
15 cloridrico al 37% e la miscela così ottenuta venne posta sotto
agitazione magnetica a riflusso per una notte. La soluzione venne
versata in acqua e la fase acquosa estratta con etile acetato. La fase
organica venne quindi essiccata su Na_2SO_4 , filtrata ed evaporata. Si
ottennero 0,161 g di prodotto (resa: 87%); Pf: 152-154°C; TLC: gel di
20 silice, eluente $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ 9/1, Rf: 0,38; ^1H NMR (DMSO, 300
MHz) δ 7.23 (d, 2H), 6.72 (d, 2H), 3.30 (brm, 2H), 1.30 (s, 6H); HPLC:
Colonna: Inertisil ODS - 3 (5 μm) 4,6 x 250 mm, T: ambiente, fase
mobile $\text{CH}_3\text{CN}/\text{KH}_2\text{PO}_4$ 50mM 40/60 (v/v), pH: tal quale, flusso:
0,75 mL/min, rivelatore UV 205 nm, tempo di ritenzione 7,39 min;
25 KF: 0,5% H_2O ; A.E. conforme per $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{O}_3\text{S}$.

ESEMPIO 3Preparazione di metil 2-(3-idrossifeniltio)isobutirrato (ST 2047)

Il prodotto venne preparato secondo la procedura descritta nel metodo A (step 1), a partire da 3-mercaptofenolo (2,000 g, 15,9 mmoli) in 40 mL di CH₃CN anidro, NaH 80% (0,572 g 19,1 mmoli) a 0°C. Dopo 5 minuti si aggiunse alla sospensione metil-2-bromoisobutirrato (2,88 g, 15,9 mmoli). La miscela di reazione così ottenuta venne lasciata sotto agitazione magnetica per una notte a temperatura ambiente. Dopo questo tempo la miscela venne versata in H₂O ed estratta con etile acetato. La fase organica venne essiccata su sodio solfato anidro e tirata a secco. Il residuo ottenuto venne purificato mediante cromatografia su gel di silice usando come eluente CHCl₃/CH₃OH 98/2. Si ottennero 2,900 g di prodotto (resa: 81%); Pf: 41,5 – 42,5°C; TLC: gel di silice, eluente CHCl₃/CH₃OH 98/2, Rf: 0,23; ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ 7.19 (t, 1H), 7.00 (d, 1H), 6.95 (brt, 1H), 6.81 (dd, 1H), 3.69 (s, 3H), 1.50 (s, 6H); HPLC: Colonna: Inertisil ODS - 3 (5µm) 4,6 x 250 mm, T: ambiente, fase mobile CH₃CN/H₂O 50/50 (v/v), pH: tal quale, flusso: 0,75 mL/min, rivelatore UV 205 nm, tempo di ritenzione 13,82 min; KF: 0,3 % H₂O; A.E. conforme per C₁₁H₁₄O₃S.

ESEMPIO 4

Preparazione di metil 2-[4-[2-(4-clorofenil)etossi]feniltio]isobutirrato (ST 1929)

Metodo B.

A metil 2-(4-idrossifeniltio)isobutirrato (ST 1923, preparato come descritto nell'esempio 1) (0,800 g, 3,54 mmoli) e 4-clorofenetil alcol (0,554 g, 3,54 mmoli) in 20 mL di THF anidro, si aggiunsero DEAD (0,801 g, 4,6 mmoli) e trifenilfosfina (1,205 g, 4,6 mmoli) a
5 piccole porzioni mantenendo la temperatura al di sotto dei 30°C. La reazione venne lasciata sotto agitazione magnetica per una notte a temperatura ambiente. Dopo questo tempo il solvente venne evaporato ed il residuo purificato mediante cromatografia su gel di silice usando come eluente esano/etile acetato 9/1. Si ottennero
10 0,416 g di prodotto oleoso (resa: 32%); TLC: gel di silice, eluente esano/etile acetato 9/1, Rf: 0,32; ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ 7.40-7.19 (m, 6H), 6.80 (d, 2H), 4.15 (t, 2H), 3.65 (s, 3H), 3.08 (t, 2H) 1.45 (s, 6H); HPLC: Colonna: Symmetry - C₁₈, (5µm) 4,6 x 250 mm, T: 30°C, fase mobile CH₃CN/H₂O 70/30 (v/v), pH: tal quale, flusso:
15 0,75 mL/min, rivelatore UV 205 nm, tempo di ritenzione 31,40 min; KF: 0,4 % H₂O; A.E. conforme per C₁₉H₂₁ClO₃S.

ESEMPIO 5

Preparazione di metil 2-[4-[2-(1-indolil)etossi]feniltio]isobutirrato (ST 1983)

20 Preparazione dell'intermedio 1-(2-idrossietil)indolo

L'intermedio, riportato in J. Med. Chem., 1998, 41/10, 1619-1639, venne preparato secondo la metodica ivi descritta, ad eccezione della durata del tempo di reazione (pari a 30 ore anziché 30 minuti), a partire da indolo (5,0 g, 42,7 mmoli), KOH (3,6 g, 64,1

mmoli) e da bromoetano (6,4 g, 51,3 mmoli) in 50 ml di DMSO anidro, a T: 25-30°C, per ottenere 5 g di prodotto oleoso (resa: 73%).

Preparazione di metil 2-[4-[2-(1-indolil)etossi]feniltio]isobutirrato (ST 1983)

5 Il prodotto venne preparato secondo la procedura descritta nel metodo B a partire da metil 2-(4-idrossifeniltio)isobutirrato (ST 1923, preparato come descritto nell'esempio 1) (0,671 g, 2,97 mmoli), 1-(2-idrossietil)indolo (0,478 g, 2,97 mmoli), DEAD (0,672 g, 3,86 mmoli), trifenilfosfina (1,011 gr, 3,86 mmoli) a piccole porzioni mantenendo
10 la temperatura al di sotto dei 30°C, in 15 mL di THF anidro. La reazione venne lasciata sotto agitazione magnetica per 48 ore a temperatura ambiente. Dopo questo tempo il solvente venne evaporato ed il residuo purificato mediante cromatografia su gel di silice usando come eluente esano/etile acetato 8/2. Si ottennero
15 complessivamente 0,500 g di prodotto ancora impuro che venne sciolto in etile acetato e lavato con una soluzione di NaOH 1N. La fase organica venne essiccata ed evaporata per dare un residuo di 0,230 g che venne nuovamente purificato mediante cromatografia su gel di silice eluendo con CHCl₃. Si ottennero 0,184 g di prodotto
20 oleoso (resa: 17%); TLC: gel di silice, eluente esano/etile acetato 8/2, Rf: 0.29; ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ 7.62 (d, 1H), 7.40 - 7.10 (m, 6H), 6.78 (d, 2H), 6.50 (d, 1H), 4.50 (m, 2H), 4.24 (m, 2H), 3.61 (s, 3H), 1.40 (s, 6H); HPLC: Colonna: Symmetry - C₁₈, (3,5µm) 4,6 x 75 mm, T: ambiente, fase mobile CH₃CN/H₂O 60/40 (v/v), pH: tal



quale, flusso: 0,90 mL/min, rivelatore UV 205 nm, tempo di ritenzione 10,70 min; KF: 1,7 % H₂O; A.E. conforme per C₂₁H₂₃NO₃S.

ESEMPIO 6

Preparazione di metil 2-[4-[2-(2-naftil)etossi]feniltio]isobutirrato

5 (ST 2011)

Il prodotto venne preparato secondo la procedura descritta nel metodo B a partire da metil 2-(4-idrossifeniltio)isobutirrato (ST 1923, preparato come descritto nell'esempio 1) (1,000 g, 4,42 mmoli), 2-(2-naftil)etanolo (0,760 g, 4,42 mmoli), DEAD (1,000 g, 5,75 mmoli) e
10 trifenilfosfina (1,500 g, 5,75 mmoli) a piccole porzioni mantenendo la temperatura al di sotto dei 30°C, in 30 mL di THF anidro. La reazione venne lasciata sotto agitazione magnetica per una notte a temperatura ambiente. Dopo questo tempo il solvente venne evaporato ed il residuo purificato mediante cromatografia su gel di
15 silice usando come eluente esano/etile acetato 9/1. Si ottennero 1,262 g di prodotto (resa: 75%); Pf: 56-57°C; TLC: gel di silice, eluente esano/etile acetato 9/1, R_f: 0.23; ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ 7.85 - 7.70 (m, 4H), 7.45 - 7.28 (m, 5H), 6.83 (d, 2H), 4.27 (t, 2H), 3.65 (s, 3H), 3.26 (t, 2H), 1.45 (s, 6H); HPLC: Colonna: Inertisil ODS
20 - 3 (5µm) 4,6 x 250 mm, T: ambiente, fase mobile CH₃CN/H₂O 80/20 (v/v), pH: tal quale, flusso: 0.75 mL/min, rivelatore UV 205 nm, tempo di ritenzione 23,51 min; KF: 0,16 % H₂O; A.E. conforme per C₂₃H₂₄O₃S.

ESEMPIO 7Preparazione di acido 2-[4-[2-(2-naftil)etossi]feniltio]isobutirrico
(ST 2036)

Ad una soluzione di ST 2011 (preparato come descritto
5 nell'esempio 6) (0,489 g, 1,29 mmoli) in 30 mL di metanolo, vennero
aggiunti 12,9 mL di NaOH 1N. La soluzione così ottenuta venne
posta a riflusso per una notte. Dopo questo tempo la soluzione
venne raffreddata, diluita con acqua, acidificata e la fase acquosa
estratta con etile acetato. La fase organica venne evaporata sotto
10 vuoto ed il residuo purificato mediante cromatografia su gel di silice
usando come eluente cloroformio. Si ottennero 0.360 g di prodotto
(resa: 76,2%); Pf: 103-104°C; TLC: gel di silice, eluente
CHCl₃/CH₃OH 98/2, R_f: 0,13; ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ 7.80 (m,
3H), 7.70 (s, 1H), 7.50 -7.38 (m, 5H), 6.83 (d, 2H), 4.26 (t, 2H), 3.35
15 (t, 2H), 1.48 (s, 6H); HPLC: Colonna: Inertisil ODS - 3 (5μm) 4,6 x
250 mm, T: ambiente, fase mobile CH₃CN/KH₂PO₄ 75/25 (v/v), pH:
tal quale, flusso: 0.75 mL/min, rivelatore UV 205 nm, tempo di
ritenzione 13,07 min; KF: 1 % H₂O; A.E. conforme per C₂₂H₂₂O₃S.

ESEMPIO 8

20 Preparazione di metil 2-[4-[(4-
metossibenzil)carbamoil]ossi]feniltio]isobutirrato (ST 2031)

Metodo C.

A ST 1923 (0,482 g, 2,13 mmoli) (preparato come descritto
nell'esempio 1) in 10 mL di THF anidro, si aggiunsero p-
25 metossibenzilisocianato (0,417 g, 2,56 mmoli) e 0,010 g di

triethylamina. La soluzione venne lasciata sotto agitazione magnetica a temperatura ambiente per 48 ore. Dopo questo tempo il solvente venne evaporato ed il residuo purificato mediante cromatografia su gel di silice usando come eluente $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ 98/2. Si ottennero 0,410 g di prodotto (resa: 50%); Pf: 64-65°C; TLC: gel di silice, eluente CHCl_3 , Rf: 0,14; ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) δ 7.44 (d, 2H), 7.28 (d, 2H), 7.10 (d, 2H), 6.90 (d, 2H), 5.29 (brm, 1H), 4.39 (d, 2H), 3.80 (s, 3H), 3.65 (s, 3H), 1.48 (s, 6H); HPLC: Colonna: Inertisil ODS-3 (5 μm) 4,6 x 250 mm, T: ambiente, fase mobile $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ 70/30 (v/v), pH: tal quale, flusso: 0,75 mL/min, rivelatore UV 205 nm, tempo di ritenzione 11,22 min; A.E. conforme per $\text{C}_{20}\text{H}_{23}\text{NO}_5\text{S}$.

ESEMPIO 9

Preparazione di metil 2-[3-[(4-

15 metossibenzil)carbamoil]ossi]feniltio]isobutirrato (ST 2139)

Il prodotto venne preparato secondo la procedura descritta nel metodo C a partire da ST 2047 (preparato come descritto nell'esempio 3) (0,240 g, 1,06 mmoli) in 7 mL di THF anidro, p-metossibenzilisocianato (0,207 g, 1,27 mmoli) e 0.010 g di triethylamina, lasciando la soluzione sotto agitazione per 18 ore a temperatura ambiente. Dopo questo tempo si aggiunsero altri 0,086 g (0,53 mmoli) di p-metossibenzilisocianato e la miscela venne lasciata sotto agitazione magnetica per altre 6 ore a temperatura ambiente. Il solvente venne quindi evaporato a secchezza e il residuo venne purificato mediante cromatografia su gel di silice eluendo con

esano/etile acetato 7/3. Si ottennero 0,320 g di prodotto che venne ulteriormente purificato mediante lavaggio con Na_2CO_3 . Si ottennero 0,200 g di prodotto oleoso (resa 48%); TLC: gel di silice, eluente esano/etile acetato 7/3, Rf: 0,37; ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) δ 7.35 – 7.18 (m, 6H), 6.90 (d, 2H), 5.25 (brm, 1H), 4.40 (d, 2H), 3.80 (s, 3H), 3.62 (s, 3H), 1.50 (s, 6H); HPLC: Colonna: Inertisil ODS-3 ($5\mu\text{m}$) 4,6 x 250 mm, T: ambiente, fase mobile $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ 50/50 (v/v), pH: tal quale, flusso: 0,75 mL/min, rivelatore UV 205 nm, tempo di ritenzione 47,02 min; A.E. conforme per $\text{C}_{20}\text{H}_{23}\text{NO}_5\text{S}$.

ESEMPIO 10

Preparazione di metil 2-[4-(2-metossi-1,1-dimetil-2-
ossoetossi)feniltio]isobutirrato (ST 1982)

Metodo D.

A metil 2-(4-idrossifeniltio)isobutirrato (ST 1923, preparato come descritto nell'esempio 1) (0,250 g, 1,11 mmoli) in 15 mL di toluene anidro, si aggiunse K_2CO_3 (0,306 g, 2,22 mmoli) e tetrabutylammonio bromuro (TBAB) (0,0193 g, 0,06 mmoli), la miscela venne scaldata a 100°C e dopo 5 minuti si aggiunse metil-2-bromoisobutirrato (0,803 g, 4,44 mmoli). Si lasciò quindi a riflusso per due giorni (temperatura del bagno ad olio 130°C). La miscela venne filtrata ed il solido venne lavato con toluene. Le fasi organiche riunite vennero essiccate ed il residuo oleoso venne sciolto con etile acetato e lavato con NaOH 1N. Il residuo ottenuto dopo evaporazione del solvente organico venne purificato mediante cromatografia su gel di silice usando come eluente esano/etile acetato 9/1. Si ottennero



0,145 g di prodotto oleoso (resa: 40%); TLC: gel di silice, eluente
esano/etile acetato 9/1, Rf: 0,17; ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) δ 7.31
(d, 2H), 6.74 (d, 2H), 3.75 (s, 3H), 3.65 (s, 3H), 1.60 (s, 6H), 1.45 (s,
6H); HPLC: Colonna: Symmetry - C_{18} , (3,5 μm) 4,6 x 75 mm, T:
5 ambiente, fase mobile $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ 50/50 (v/v), pH: tal quale, flusso:
0,75 mL/min, rivelatore UV 205 nm, tempo di ritenzione 13,00 min;
A.E. conforme per $\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{O}_5\text{S}$.

ESEMPIO 11

Preparazione di metil 2-[3-[2-(3-

10 idrossifenossi)etossi]fenossi]isobutirrato (ST1877) e metil 2-[3-[2-[3-
(2-metossi-1,1-dimetil-2-ossoetossi)fenossi]etossi]fenossi]isobutirrato
(ST1878)

I prodotti vennero preparati secondo la procedura descritta nel
metodo D a partire da 3,3-etilendiossidifenolo (2,000 g, 8,1 mmoli),
15 K_2CO_3 (4,500 g, 32,4 mmoli), TBAB (0,131 g, 0,4 mmoli) e metil-2-
bromoisobutirrato (11,611 g, 64 mmoli) in 100 mL di toluene. La
miscela venne scaldata a 130°C per tre giorni, poi raffreddata e
filtrata. Il solido ottenuto venne lavato con toluene, le fasi organiche
riunite vennero evaporate a secchezza sotto vuoto ed il residuo
20 oleoso purificato mediante cromatografia su gel di silice usando
come eluente esano/etile acetato 8/2. Si ottennero due prodotti: il
monoderivato ST 1877 (0,700 g) (resa: 25%) ed il bisderivato ST
1878 (1,100 g) (resa: 30,4%).

Dati analitici per ST 1877

Pf: 77-79°C; ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ 7.13 (t, 2H), 6.62 – 6.40 (m, 6H), 4.25 (s, 4H), 3.78 (s, 3H) 1.60 (s, 6H); HPLC: Colonna Inertisil ODS – 3 (5 μm); 4,6 x 250 mm, T: 30°C; fase mobile:
5 CH₃CN/H₂O (60/40 v/v), pH: 3,2, flusso: 1,0 mL/min, rivelatore UV 205 nm, tempo di ritenzione: 8,76 min; A.E. conforme per C₁₉H₂₂O₆.

Dati analitici per ST 1878

Pf: 60-62°C; ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ 7.13 (t, 2H), 6.60 (d, 2H), 6.41 (m, 4H), 4.26 (s, 4H), 3.78 (s, 6H) 1.60 (s, 12H); HPLC:
10 Colonna Inertisil ODS – 3 (5 μm), 4,6 x 250 mm, T: 30°C, fase mobile: CH₃CN/H₂O (60/40 v/v), pH: 3,2, flusso: 1,0 mL/min, rivelatore UV 205 nm, tempo di ritenzione: 23,92 min; A.E. conforme per C₂₄H₃₀O₈.

ESEMPIO 12

15 Preparazione di dimetil 2-[4-[1-(4-idrossifenil)-1-metiletil]fenossi]malonato (ST 2020)

Il prodotto venne preparato secondo lo schema descritto per il metodo A, step 1, seguendo la procedura seguente: ad una sospensione di rodio bivalente acetato dimero (0,220 g, 0,5 mmoli) e
20 bisfenolo A (2,2-bis-(4-idrossifenil)-propano) (3,400 g, 15 mmoli) in 100 mL di toluene anidro, si aggiunse goccia a goccia, sotto corrente di azoto, una soluzione di diazomalonato (2,846 g, 18 mmoli) (preparato come descritto in Org. Synth.: 1973, V, 179) in 50 mL di toluene anidro, avendo cura di mantenere la temperatura fra 15 e
25 20°C. La miscela di reazione venne quindi posta a riflusso a 120-

130°C per 24 ore sotto azoto. Dopo questo tempo la miscela venne filtrata e il toluene evaporato sotto vuoto. Il residuo ottenuto venne purificato mediante cromatografia su gel di silice usando come eluente esano/etile acetato 8/2. Si ottennero 1,700 g di prodotto oleoso (resa: 32%); TLC: gel di silice, eluente esano/etile acetato 7/3, $R_f = 0,23$; ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) δ 7.16 (m, 4H), 6.90 (d, 2H), 6.87 (d, 2H), 5.12 (s, 1H), 3.90 (s, 6H), 1.62 (s, 6H); HPLC: Colonna: Inertisil ODS - 3 ($5\mu\text{m}$) 4,6 x 250 mm, T: 30°C, fase mobile $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ 70/30 (v/v), pH: tal quale, flusso: 0,75 mL/min, rivelatore UV 205 nm, tempo di ritenzione 7,00 min; KF: 0,6 % H_2O ; A.E. conforme per $\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{O}_6$.

ESEMPIO 13

Preparazione di dimetil 2-[4-(1-{4-[2-metossi-1-(metossicarbonil)-2-ossoetossi]fenil}-1-metiletil)fenossi]malonato (ST 2048)

Il prodotto venne preparato secondo lo schema descritto per il metodo A, step 1, seguendo la procedura già descritta nell'esempio 12 a partire da rodio bivalente acetato dimero (0,0885 g, 0,2 mmoli) e ST 2020 (1,230 g, 3,4 mmoli) (preparato come descritto nell'esempio 12) in 36 mL di toluene anidro, aggiungendo goccia a goccia diazomalonato (1,882 g 11,9 mmoli), in 18 mL di toluene anidro, avendo cura di mantenere la temperatura fra 15 e 20°C. La miscela di reazione venne posta a riflusso a 120-130°C per 24 ore sotto azoto. Dopo questo tempo la miscela venne filtrata e il toluene evaporato sotto vuoto. Il residuo ottenuto venne purificato per

cromatografia su colonna di gel di silice usando come eluente esano/etile acetato 8/2. Si ottennero 0,430 g di prodotto oleoso (resa: 26%); TLC: gel di silice, eluente esano/etile acetato 6/4, Rf: 0,46; ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) δ 7.20 (d, 4H), 6.90 (d, 4H), 5.22 (s, 2H), 3.90 (s, 12H), 1.61 (s, 6H); HPLC: Colonna: Inertisil ODS - 3 (5 μm) 4,6 x 250 mm, T: 30°C, fase mobile $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ 70/30 (v/v), pH: tal quale, flusso: 0,75 mL/min, rivelatore UV 205 nm, tempo di ritenzione 9,68 min; KF: 0,7 % H_2O ; A.E. conforme per $\text{C}_{25}\text{H}_{28}\text{O}_{10}$.

ESEMPIO 14

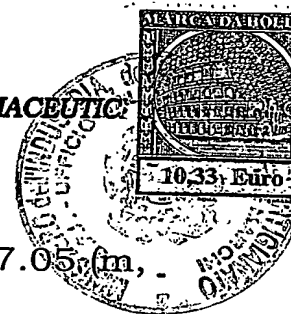
10 Preparazione di metil 2-[3-[2-(2-naftil)etossi]feniltio]isobutirrato
(ST 2167)

Il prodotto venne preparato secondo la procedura descritta nel metodo B (ad eccezione del DEAD che venne sostituito con DIAD) a partire da metil 2-(3-idrossifeniltio)isobutirrato (ST 2047) (1,110 g, 4,9 mmoli), 2-(2-naftil)etanolo (0,842 g, 4,9 mmoli), DIAD (1,290 g, 6,37 mmoli), trifenilfosfina (1,670 g, 6,37 mmoli) in 20 mL di THF anidro. La reazione venne lasciata sotto agitazione magnetica per una notte a temperatura ambiente. Dopo questo tempo il solvente venne evaporato ed il residuo purificato per cromatografia su gel di silice usando come eluente esano/etile acetato 7/3. Il prodotto venne ulteriormente purificato sciogliendolo in etile acetato e lavando la fase organica con una soluzione di Na_2CO_3 . La fase organica venne seccata su sodio solfato ed il solvente evaporato sotto vuoto. Si ottennero 1,14 g di prodotto (resa: 61,2%); TLC: gel di silice, eluente esano/etile acetato 9/1, Rf: 0,20; ^1H NMR (CDCl_3 , 300

15

20

25



MHz) δ 7.80 (m, 3H), 7.75 (s, 1H), 7.45 (m, 3H), 7.25 (t, 1H), 7.05 (m, 2H), 6.90 (d, 1H), 4.25 (t, 2H), 3.65 (s, 3H), 3.30 (t, 2H), 1.50 (s, 6H);

HPLC: Colonna: Inertisil ODS - 3 ($5\mu\text{m}$) 4,6 x 250 mm, T: ambiente, fase mobile $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ 80/20 (v/v), pH: tal quale, flusso: 0,9

5 mL/min, rivelatore UV 205 nm, tempo di ritenzione 18,91 min; KF: 1,0 % H_2O ; A.E. conforme per $\text{C}_{23}\text{H}_{24}\text{O}_3\text{S}$.

ESEMPIO 15

Costrizione dell'aorta

Vennero usati Ratti Wistar maschi del peso di 100-120 gr, stabulati 5 per gabbia (dimensioni delle gabbie: 425 mm x 266mm x 180 mm con lettiera di segatura di legno), ad una temperatura di 21 ± 1 °C e umidità: $50\pm 15\%$, con un ciclo luce/buio: 12/12 h e con 15-20 ricambi aria/ora. Gli animali vennero alimentati con mangime LP ALTROMIN (REIPER) ed acqua di fonte ad libitum.

Induzione dell'ipertrofia cardiaca

L'ipertrofia ventricolare sinistra venne indotta nei ratti anestetizzati con Nembutal sodico, mediante costrizione dell'aorta addominale con una clip (\varnothing 0,8 mm) posta nell'aorta addominale tra il diaframma e le diramazioni renali; un gruppo di animali che poi venne utilizzato come controllo subì la stessa operazione ma non ebbe l'impianto della clip, non subendo quindi la costrizione dell'aorta (Bianchi).

Gli animali vennero quindi randomizzati nei seguenti gruppi:

Bianchi: operati senza costrizione aortica (8 animali)

Controlli: operati con costrizione aortica (8 animali)

CLO: operati con costrizione aortica e trattati per 12 settimane dal giorno successivo l'operazione con i composti secondo l'invenzione (11 animali).

Valutazione della funzione cardiaca

5 Al termine del trattamento venne valutata la funzione cardiaca negli animali anestetizzati con Nembutal sodico, mediante un catetere di polietilene inserito nel ventricolo sinistro attraverso la carotide e collegato ad un trasduttore di pressione (Sthaman p23XL) ed a un amplificatore (Biomedica Mangoni bm 61).

10 I parametri registrati furono: frequenza cardiaca, pressione intraventricolare sistolica e telediastolica, e le derivate positiva e negativa della pressione intraventricolare che vennero registrati su personal computer tramite un apposito sistema di acquisizione (IDAS). Le rilevazioni vennero effettuate per 30 minuti.

15 Valutazioni Macroscopiche

Al termine degli esperimenti gli animali vennero sacrificati mediante una dose letale di Nembutal, venne aperta la cavità addominale, esteriorizzati i visceri per verificare la corretta applicazione della clip aortica, vennero quindi prelevati il cuore, i
20 polmoni ed il fegato che dopo l'osservazione macroscopica di eventuali anomalie, vennero accuratamente asciugati e pesati.

Risultati preliminari ottenuti con questo test hanno mostrato che i composti secondo l'invenzione sono ben tollerati e normalizzano i valori pressori nel gruppo trattato rispetto ai gruppi
25 di controllo.

ESEMPIO 16

Trasfezione transiente di cellule eucariotiche per valutare l'attività agonistica di ligandi del PPAR α

I saggi di transattivazione in cellule eucariotiche consentono di valutare quantitativamente l'abilità di un ipotetico ligando nel favorire l'interazione di un fattore trascrizionale col proprio elemento di risposta all'interno di un promotore.

Perché il recettore attivato dai proliferatori perossisomiali isoforma α (PPAR α) eserciti la sua funzione di modulatore trascrizionale è necessaria la sua dimerizzazione con il recettore per l'acido 9-*cis* retinoico (RXR). Il dimero formatosi è in grado di legarsi all'elemento di risposta ai proliferatori perossisomiali (PPRE), localizzato nel promotore dei geni bersaglio, solo se attivato dalla presenza di un ligando di almeno uno dei due recettori.

Un saggio di transattivazione richiede quindi la contemporanea presenza nella linea cellulare prescelta:

- a) di una quantità sufficiente di PPAR α ;
- b) di una quantità sufficiente del recettore per l'acido 9 *cis*-retinoico (RXR);
- c) di un plasmide chimerico contenente il gene-reporter controllato da un PPRE, posto a monte di un promotore eterologo virale. Nel nostro caso il gene-reporter è la cloramfenicolo-acetil trasferasi (CAT).

Qualora i livelli endogeni di PPAR α ed RXR siano insufficienti, essi possono essere supplementati dall'esterno, tramite trasfezione di vettori d'espressione contenenti i geni dei recettori in questione.

Il plasmide pCH110 contiene il gene per la β -galattosidasi e
5 viene co-trasfettato insieme al gene-reporter CAT, fornendo il controllo interno per l'efficienza di trasfezione e la normalizzazione dei risultati.

Procedura sperimentale

Vennero usate linee cellulari di fibroblasti di rene di scimmia
10 (COS-7). Le cellule vennero trasfettate con il gene-reporter (vedi punto c precedente) ed un plasmide di espressione contenente la sequenza codificante del gene (cDNA) del PPAR α . Le cellule vennero esposte a concentrazioni crescenti dei composti in esame e venne valutata l'attività della CAT. Come controllo vennero usate cellule
15 non trattate. Un aumento dei livelli di CAT indica l'attivazione della trascrizione genica dipendente dal PPAR α , mediante il suo legame con PPRE (attività agonistica dei composti).

Coltura cellulare

Fibroblasti di rene di scimmia (COS-7) vennero coltivati
20 secondo le usuali tecniche di coltura cellulare, a 37°C in atmosfera a 5% v/v di anidride carbonica usando come mezzo di crescita DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) modificato con 3,7 g/l di bicarbonato di sodio, 4 mM di L-glutamina, 4,5 g/l di glucosio, 1



mM di piruvato di sodio e 10% v/v di foetal bovine serum, in presenza di streptomicina 100 µg/ml e penicillina 100 U/ml finali.

Trasfezioni transitorie di cellule COS-7

Le cellule COS-7 vennero co-trasfettate transitoriamente mediante la tecnica della co-precipitazione degli acidi nucleici con calcio fosfato.

Le cellule vennero piastrate, alla densità di 3×10^5 cellule/pozzetto, in piastre da 6 pozzetti da 35 mm di diametro 24 ore prima della trasfezione. Il mezzo di coltura venne cambiato 2 ore prima della trasfezione e in seguito ciascun pozzetto venne trattato con 280 µl della miscela di trasfezione così preparata:

- 1) plasmide di espressione contenente il cDNA del PPAR α (2,5 µg)
 - 2) plasmide contenente il gene-reporter CAT (5 µg)
 - 3) pCH110 (1 µg);
- + 17,5 µl di cloruro di calcio 2 M.

Si aggiunse una quantità di acqua fino ad un volume finale di 140 µl. A questa miscela di plasmidi e sale venne aggiunto un pari volume della soluzione HBS 2x pH 7,1 (cloruro di sodio 16 g, cloruro di potassio 0,74 g, sodiofosfato basico diidrato 0,27 g, destrosio 2 g, Hepes 10 g per litro).

Le cellule vennero incubate per 6 ore a 37°C in atmosfera a 5% v/v di anidride carbonica.

Il trattamento con i composti secondo l'invenzione e con i composti di riferimento: clofibrato e acido 4-cloro-6-(2,3 xilidino)-2-pirimidiltioacetico (WY-14,643) venne effettuato in 2 ml di terreno fresco per 24 h. Cellule non trattate vennero usate come controllo
5 negativo. L'abilità dei vari trattamenti di influenzare la trascrizione del gene-reporter CAT venne valutata radiometricamente su estratti proteici da cellule trattate e non.

Preparazione di estratti proteici cellulari e saggio di attività
CAT

10 Dopo il trattamento, le cellule vennero lavate 2 volte con tampone fosfato (5 ml) e rimosse meccanicamente dal pozzetto in tampone TEN (Tris [idrossimetil] amminometano 10 mM pH 8, acido etilendiammino tetraacetico 1 mM pH 8, cloruro di sodio 0,1 M). Dopo centrifugazione a 4°C per 2 minuti a 1000 rotazioni per minuto
15 (rpm) in una centrifuga Eppendorf 5417R (rotore F453011), le cellule vennero risospese in 0,15 ml di tampone (Tris [idrossimetil] amminometano - acido cloridrico 0,25 M pH 8) e lisate grazie a ripetuto congelamento- scongelamento (3 cicli di 5 minuti).

I materiali insolubili cellulari vennero rimossi per
20 centrifugazione come descritto sopra ed il surnatante venne recuperato ed utilizzato per il saggio dell'attività CAT.

Il saggio per la valutazione dell'attività CAT comprende:

- 1) 50 µl di estratto cellulare proteico (scaldato a 65°C per 10 minuti)

2) 10 μ l di n-butiril-Coenzima A (3,5 mg/ml)

3) 5 μ l di [14 C] cloramfenicolo (0,25 μ Ci);

in un volume finale portato a 100 μ l con acqua.

Dopo circa 2 ore di incubazione a 37°C la reazione venne
5 bloccata con 2 volumi di xilene/2,6,10,14 tetrametil-pentadecano (in
miscela 1:2 v/v). Dopo estrazione con tale solvente, 150 μ l della fase
superiore vennero aggiunti a 5 ml di liquido di scintillazione ed
analizzati al beta counter (scintillatore) per determinare il contenuto
di [14 C] butirril-cloramfenicolo formatosi in seguito alla reazione
10 enzimatica.

Test per la determinazione dell'attività β -galattosidasica

Come controllo interno per la normalizzazione dell'attività della
CAT in rapporto all'efficienza di trasfezione, si usò l'attività β -
galattosidasica codificata dal gene corrispondente presente nel
15 plasmide pCH110.

Si valutò l'attività di 20 μ l di estratti proteici (vedi sopra) sul
substrato ONPG (O-nitrofenil- β -D-galattopiranoside) 2 mg/ml in
presenza di cloruro di potassio 10 mM, cloruro di magnesio 1 mM, β -
mercaptoetanolo 50 mM in tampone fosfato. Dopo una incubazione
20 di 15-120 minuti a 37°C (dipendente dalla velocità d'apparizione
della tipica colorazione gialla), la reazione venne bloccata con 200 μ l
di carbonato di sodio 1M. I campioni vennero incubati per 10 minuti

a temperatura ambiente e quindi analizzati allo spettrofotometro misurando l'assorbanza alla lunghezza d'onda di 420 nm (A_{420}).

Per la normalizzazione dei risultati del saggio CAT rispetto all'attività β -galattosidasica venne usata la seguente formula:

5

conte per minuto (cpm) campione CAT - cpm campione bianco

$$\text{unità attività } \beta\text{-galattosidasi } (\beta\text{-gal})^* \propto \frac{\text{volume campione CAT (50 } \mu\text{l)}}{\text{volume campione } \beta\text{-gal (20 } \mu\text{l)}}$$

$$*\text{unità attività } \beta\text{-galattosidasica} = \frac{A_{420} \propto \text{fattore diluizione}}{\text{tempo incubazione (minuti)}}$$

10

I risultati preliminari ottenuti con questo saggio mostrano che i composti secondo l'invenzione sono agonisti del PPAR α .

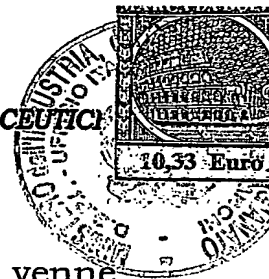
ESEMPIO 17

15

Incremento dei livelli di HDL - Colesterolo nel topo db/db

In questo esperimento vennero utilizzati topi db/db in cui l'espressione del PPAR α è superiore alla norma (Memon et al., Endocrinology: 4021 - 4031, 2000) ed i livelli di HDL - Colesterolo sono fortemente elevati (Silver et al., J Biol Chem 274: 4140 - 4146, 20 1999).

I topi C57BL/KsJ db/db vennero acclimatati per una settimana in condizioni standard ($22 \pm 2^\circ\text{C}$; $55 \pm 15\%$ di umidità; 15 - 20 ricambi di aria/ora; 12 ore di ciclo luce - oscurità con 7,00 -



19,00 luce) con dieta standard 4 RF21 (Mucedola). Il sangue venne prelevato in condizioni di post -assorbimento (digiuno ore 8,30 - 16,30) dalla vena caudale con l'aiuto di un catetere Jelco 22G (Johnson and Johnson). Nel plasma vennero controllati i livelli di glucosio, insulina, trigliceridi, colesterolo, acidi grassi liberi e urea per un'omogenea distribuzione dei topi nei gruppi di trattamento.

All'inizio del trattamento venne controllato il peso corpo degli animali e predisposto il monitoraggio del consumo di acqua e mangime.

10 I topi vennero trattati due volte al giorno (ore 8,30 e 18,30), per via orale, per 10 o 14 giorni.

Il composto testato, ottenuto come descritto nell'esempio 4 (ST 1929) venne somministrato alla dose di 24 mg/Kg in 10 ml/Kg di veicolo (CMC 1% contenente Tween 80 0,5% in H₂O deionizzata).

15 Anche gli altri composti testati vennero somministrati ad una dose equivalente a quella dell'esempio 4.

Il ciprofibrato, un noto PPAR α agonista (Varanasi et al., J Biol Chem 271: 2147 - 2155, 1996; Latruffe et al. Cell Biochem Biophys 32 Spring: 213 - 220, 2000) venne somministrato alla dose di 20 mg/kg (Dwivedi et al., Toxicol Pathol 17: 16 - 26, 1989; Qi et al., Proc Natl Acad Sci USA 96: 1585 - 1590, 1999).

Gli animali vennero sacrificati (per decapitazione) in condizioni di post - assorbimento (digiuno ore 9,30 - 16,30), a 7 ore dall'ultimo trattamento. Nel siero vennero determinati i livelli di alcuni importanti parametri del metabolismo dei lipidi e dei carboidrati.

I livelli di HDL - Colesterolo vennero misurati trattando il siero con il reagente precipitante (ABX Diagnostics) a base di acido fosfotungstico che allontana i chilomicroni, le VLDL e LDL lipoproteine e determinando nel sovranatante i livelli di HDL -
5 Colesterolo con l'impiego del Kit Cholesterol (ABX Diagnostics) all'autoanalizzatore Cobas Mira S (Roche).

I risultati indicano che i composti dell'invenzione sono in grado, nel topo db/db, di innalzare i valori di HDL - Colesterolo (indice di un'attività PPAR α agonista) in maniera simile o superiore
10 al composto di riferimento, il ciprofibrato (Tabella 1) .

Tabella 1

Incremento dei livelli di HDL - Colesterolo nel topo db/db

Composto	Dose mg/Kg	Durata del trattamento (gg)	Incremento dei livelli di HDL - Colesterolo (%)
Ciprofibrato	20	14	+ 52 ▲
Composto dell'Esempio 4 (ST 1929)	24	10	+ 80 ▲
Composto dell'Esempio 8 (ST 2031)	Equivalente a 24 mg/di ST 1929	10	+ 51 ▲

I composti di formula (I) della presente invenzione, possono essere utilizzati in quanto tali o sotto forma di derivati farmaceuticamente accettabili, quali sali, o derivati che migliorano
5 gli aspetti farmacocinetici, pur mantenendo la specifica attività (profarmaci).

Per quanto attiene l'aspetto industriale della presente invenzione, i medicinali saranno sotto forma di opportune formulazioni (o composizioni) farmaceutiche, preparate secondo
10 metodi convenzionali noti all'esperto del settore. Esempi di composizioni farmaceutiche sono compresse, capsule, supposte, pillole, bustine, forme liquide per somministrazione orale, quali soluzioni, sospensioni ed emulsioni. Forme per somministrazione
orale o in generale enterale, a rilascio controllato. Forme per
15 somministrazione parenterale, quali forme iniettabili.

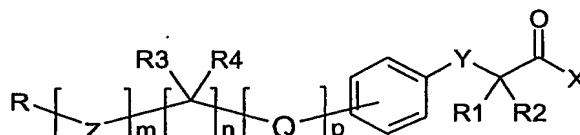
Pomezia, li 15 gennaio 2002



SIGMA TAU
IND. FARM. RIUNITE S.p.A.
Viale Shakespeare, 47
00144 ROMA

RM 2002 A 000014
RIVENDICAZIONI

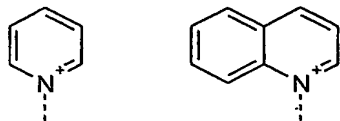
1. Composti di formula (I)



(I)

5 in cui:

R rappresenta -H, -YCR5R6COX, aril o eteroaril mono o biciclici (eventualmente sostituiti con gruppi del tipo -YCR5R6COX, alogeni, nitro, idrossi, alchil, alcossi eventualmente sostituiti con alogeni), arilalchil o eteroarilalchil mono o biciclici (in cui l'arile o l'eteroarile sono eventualmente sostituiti con gruppi del tipo -YCR5R6COX, alogeni, nitro, idrossi, alchil, alcossi eventualmente sostituiti con alogeni). L'eteroaril può essere eventualmente carico, del tipo:



in cui la carica positiva è bilanciata da un opportuno controione negativo;

m rappresenta 0-1

n rappresenta 0-3; quando n rappresenta 1, R3 e R4 uguali o diversi sono scelti fra H o alchile C₁-C₅;

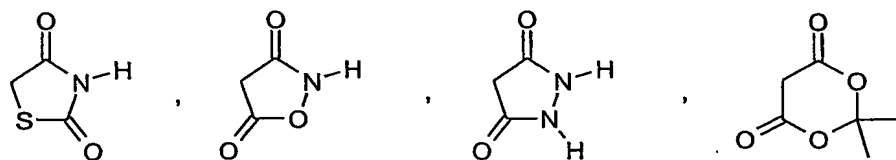
quando n rappresenta 2 o 3, R3 è uguale a R4 e rappresenta H;



p rappresenta O-1

X rappresenta -OH, -O-alchile C₁-C₃;

R1 ed R2 uguali o diversi sono scelti tra: -H; alchile C₁-C₅; -
alcossi eventualmente sostituito con alogeni; -fenossi
eventualmente sostituito con alogeni, nitro, idrossi, alchili; -
benzilossi eventualmente sostituito con alogeni, nitro, idrossi,
alchili; -COX; oppure insieme a COX della formula generale (I)
forma un ciclo del tipo:



R5 e R6 uguali o diversi sono scelti fra i gruppi elencati per R1 ed
R2;

Q e Z uguali o diversi sono scelti fra: NH, O, S, -NHC(O)O-,
NHC(O)NH-, -NHC(O)S-, -OC(O)NH-, -NHC(S)O-, -NHC(S)NH-, -
C(O)NH-;

e Y rappresenta O, S.

2. Composti di formula (I) della rivendicazione 1, per uso in campo medico.
3. Composizione farmaceutica comprendente come principio attivo un composto di formula (I) della rivendicazione 1, ed almeno un eccipiente e/o diluente farmaceuticamente accettabile.

4. Composizione secondo la rivendicazione 3, sotto forma di compresse, capsule, pillole, bustine, flaconi, polveri, supposte, soluzioni, sospensioni, emulsioni o liposomica.
5. Composizione secondo la rivendicazione 4, somministrabile per via enterale o parenterale.
6. Uso dei composti di formula (I) della rivendicazione 1, per la preparazione di un medicamento per il trattamento di patologie che rispondono all'attivazione del recettore PPAR α .
7. Uso secondo la rivendicazione 6, in cui le patologie sono scelte nel gruppo consistente di: insufficienza cardiaca, iperlipemie e aterosclerosi.

Pomezia, lì 15 gennaio 2002

SIGMA TAU
IND. FARM. RIUNITE S.p.A.
Viale Shakespeare, 47
00144 ROMA

